



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 54 745 A1 2004.06.03

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 54 745.9  
(22) Anmeldetag: 23.11.2002  
(43) Offenlegungstag: 03.06.2004

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: C08B 31/00  
C08B 37/06, C08B 31/12

(71) Anmelder:  
Supramol Parenteral Colloids GmbH, 61191  
Rosbach, DE

(72) Erfinder:  
Sommermeyer, Klaus, Dr., 61191 Rosbach, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Imidazolide von Polysaccharid Aldonsäuren, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung zur Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe

(57) Zusammenfassung: Bei der Kopplung von Polysaccharid-Derivaten wie z. B. Hydroxyethylstärke (HES) an pharmazeutische Wirkstoffe treten Nachteile in Form von unerwünschten Nebenreaktionen auf.

Die Erfindung beschreibt neue Polysaccharid-Aldonsäure-Imidazolide, ihre Synthese sowie ihre Verwendung zur Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe ohne die oben beschriebenen Nachteile.

**Beschreibung**

[0001] Die Konjugation von pharmazeutischen Wirkstoffen insbesondere von Proteinen mit Polyethylenglycol-Derivaten ("PEGylierung") oder Polysacchariden wie Dextrane oder insbesondere Hydroxyethylstärke ("HESylierung") hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen mit der Zunahme an pharmazeutischen Proteinen aus der biotechnologischen Forschung.

[0002] Oft haben solche Proteine eine zu kurze biologische Halbwertszeit, welche durch Kopplung an die oben angeführten Polymeren-Verbindungen wie PEG oder HES gezielt verlängert werden kann. Durch die Kopplung können aber auch die antigenen Eigenschaften von Proteinen positiv beeinflusst werden. Im Falle von anderen pharmazeutischen Wirkstoffen kann durch die Kopplung die Wasserlöslichkeit erheblich vergrößert werden.

[0003] HES ist das hydroxyethylierte Derivat des in Wachsmaisstärke zu über 95 % vorkommenden Glucosepolymers Amylopektin. Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, die in  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen vorliegen und  $\alpha$ -1,6-glykosidische Verzweigungen aufweisen. HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zur Zeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8 (8, 1987) Seite 271 - 278 und Weidler et. al., Arzneimittelforschung/Drug Res., 41, (1991) Seite 494 - 498).

[0004] HES wird im wesentlichen über das gewichtsgemittelte mittlere Molekulargewicht  $M_w$ , das Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichts  $M_n$ , die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Die Substitution mit Hydroxyethylgruppen in Ätherbindung ist dabei an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 6 der Anhydroglucoseeinheiten möglich. Der Substitutionsgrad kann dabei als DS ("degree of substitution"), welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemoleküle aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS ("molar substitution") beschrieben werden, womit die mittlere Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.

[0005] In DE 196 28 705 und DE 101 29 369 werden Verfahren beschrieben, wie die Kopplung mit Hydroxyethylstärke in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) über das entsprechende Aldonsäurelacton der Hydroxyethylstärke durchgeführt werden kann mit freien Aminogruppen von Hämoglobin bzw. Amphotericin B.

[0006] Da in wasserfreien, aprotischen Lösungsmitteln gerade im Falle der Proteine oft nicht gearbeitet werden kann, entweder aus Löslichkeitsgründen aber auch Gründen der Denaturierung der Proteine, stehen auch Kopplungsverfahren mit HES im wasserhaltigen Milieu zur Verfügung. Z.B. gelingt die Kopplung der am reduzierenden Kettenende selektiv zur Aldonsäure oxidierten Hydroxyethylstärke durch

Vermittlung von wasserlöslichem Carbodiimid EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) (PCT/EP 02/02928). Sehr oft jedoch ist der Einsatz von Carbodiimiden mit Nachteilen behaftet, da Carbodiimide sehr häufig inter- oder intramolekulare Vernetzungsreaktionen der Proteine verursachen als Nebenreaktionen.

[0007] Im Falle von phosphatgruppenhaltigen Verbindungen wie Nukleinsäuren gelingt die Kopplung oft gar nicht, da die Phosphatgruppen mit EDC ebenfalls reagieren können (S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC-Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 1993, Seite 199).

[0008] Es bestand daher die Aufgabe, solche aktivierte Derivate von Hydroxyethylstärke oder anderen Polysacchariden zu finden, die in rein wässrigen Systemen oder auch in Lösungsmittelgemischen mit Wasser die Kopplung an Proteine oder andere Wirkstoffe gezielt ermöglichen, ohne die oben beschriebenen Nachteile aufzuweisen.

[0009] Es wurde nun überraschender Weise gefunden, dass aus den am reduzierenden Kettenende selektiv zu den Aldonsäuren oxidierten Hydroxyethylstärken sowie anderen Polysacchariden wie z.B. Wachsmaisstärke-Abbaufractionen in trockenem aprotischem Lösungsmittel wie Dimethylacetamid (DMA) oder Dimethylformamid (DMF) mit N-Heterozyklen die entsprechenden Azolide (Amide) hergestellt werden konnten. Solche Azolide können als aktivierte Säuren aufgefasst werden (H.A. Stab., Angew. Chemie 74 (1962) 12, Seite 407 ff.). Sie setzen sich im wässrigen Milieu mit nukleophilen  $\text{HN}_2$ -Gruppen zu (stabileren) Amidinen um. Als Nebenreaktion tritt eine Verseifung mit Wasser auf zur freien Säure und zu dem freien N-Heterozyklus. Besonders bekannt für diese Reaktion ist N-Acetyl-Imidazol, welches bekanntlich als mildes Acylierungsmittel eingesetzt wird.

[0010] Die Umsetzung der HES-Aldonsäuren gelingt z.B. in trockenem DMA unter Wasserausschluß mit N,N-Carbonyldiimidazol (CDI) in glatter Reaktion bei Raumtemperatur zum HES-Säure-Imidazolid,  $\text{CO}_2$  und Imidazol. Dabei ist insbesondere überraschend, dass keine Nebenreaktion der HES-Moleküle eintritt über die Reaktion der im Extremüberschuß vorliegenden OH-Gruppen der Anhydroglucosen mit Carbonyldiimidazol und ebenfalls keine unselektive Aktivierung von OH-Gruppen als Nebenreaktion.

[0011] Die HES-Imidazolide können aus der Lösung in DMA durch trockenes Ethanol oder Aceton gefällt werden und durch mehrfaches Umfällen von Imidazol befreit werden. Solche HES-Säure-Imidazolide können dann vorteilhafter Weise in Substanz isoliert zur HESylierung verwendet werden. Dabei treten dann keine Nebenreaktionen wie oben beschrieben mit EDC aktivierter HES-Säure auf. Bei der Aktivierung von HES-Säure mit EDC treten auch unerwünschte Umlagerungen des primär gebildeten O-Acyl-Isoharnstoff-Derivates zum N-Acyl-Harnstoff-Derivat auf,

welches sich nur schwer vom gewünschten Reaktionsprodukt abtrennen lässt. Solche Umlagerungen sind bei die Imidazoliden nicht bekannt, was ein weiterer Vorteil der Erfindung darstellt. Alternativ können aber auch die Imidazole der Hydroxyethylstärke oder Stärke-Abbau-Aldonsäuren unmittelbar nach der Herstellung im aprotischen Lösungsmittel als HESylierungsmittel verwendet werden wenn das aprotische Lösungsmittel genügend mit Wasser mischbar ist und der Reaktionspartner gelöst bleibt. Im Falle von Dimethylsulfoxid oder Dimethylacetamid oder Dimethylformamid ist dies oft gegeben. Der Anteil des freien Imidazols aus der Synthese mit CDI stört dabei in der Regel nicht.

[0012] Geeignete N-Heterozyklen zur Herstellung der HES oder Stärke Aldonsäure-Imidazole sind in der Literatur aufgeführt (H.A. Stab., Angew. Chemie 74 (1962) 12, Seite 407 ff.). Besonders bevorzugt ist dabei das Imidazol.

[0013] Als Aldonsäure-Komponente können geeignete Hydroxyethylstärke-Fractionen, die selektiv am reduzierenden Kettenende zur entsprechenden Aldonsäure gemäß dem Stand der Technik oxidiert worden sind, eingesetzt werden aber auch andere Stärkederivate wie z.B. Hydroxypropylstärke. Ebenfalls kommen infrage die in der deutschen Patentanmeldung 102 17 994 beschriebenen hyperverzweigten Stärkefraktionen.

#### Ausführungsbeispiel

##### Beispiel 1

##### Herstellung von HES 10/0,4-Säure Imidazolid

[0014] 5 g getrocknete, am terminalen reduzierenden Kettenende selektiv nach DE 196 28 705 Literaturangaben oxidierte Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht  $M_w = 10.000$  und einem Substitutionsgrad  $MS = 0,4$  Aldonsäure werden in 30 ml trockenem Dimethylacetamid bei  $40^\circ\text{C}$  gelöst und nach Abkühlen mit äquimolaren Mengen N'-N-Carbonyldiimidazol unter Feuchtigkeitsausschluss versetzt. Danach wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Reaktionsprodukt wird anschließend mit trockenem Aceton gefällt und zur Reinigung mehrfach umgefällt.

##### Beispiel 2

##### Herstellung von HES 10/0,4-Säure gekoppeltem Myoglobin

[0015] 15 mg Myoglobin werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Zu der Lösung werden 1,25 g HES 10/0,4-Imidazolid, hergestellt nach Beispiel 1, gelöst in 10 ml Dimethylacetamid, über 1 Stunde portionsweise zugegeben und der pH-Wert bei 7,5 konstant gehalten durch Zugabe von Natronlauge.

[0016] Der Ansatz wird über Nacht rühren gelassen.  
[0017] Die Bildung von hesyliertem Myoglobin wird über Gel-Permeationschromatographie mit einer Ausbeute von 80%, bezogen auf das eingesetzte Myoglobin, bestimmt.

#### Patentansprüche

1. Aldonsäure-Imidazole von selektiv am reduzierenden Kettenende oxidierten Stärkefraktionen oder Stärkefraktions-Derivaten.

2. Imidazole gemäß Anspruch 1, wobei die Stärkefraktionen Abbaufractionen des Amylopektins sind.

3. Imidazole gemäß Anspruch 2, wobei die Abbaufractionen des Amylopektins durch Säureabbau und/oder Abbau durch  $\alpha$ -Amylase von Wachsmaisstärke gewonnen werden.

4. Imidazole gemäß Anspruch 3, wobei die Stärkefraktionen ein mittleres Molekulargewicht  $M_w$  von 2.000 – 50.000 Dalton aufweisen und eine mittlere Verzweigung von 5 – 15 mol%  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen.

5. Imidazole gemäß Anspruch 1, wobei die Stärkefraktions-Derivate Hydroxyethyl-Derivate von Abbaufractionen der Wachsmaisstärke sind.

6. Imidazole gemäß Anspruch 5, wobei das mittlere Molekulargewicht  $M_w$  der Hydroxyethylstärke-Fractionen im Bereich von 2 – 300.000 Dalton liegt und der Substitutionsgrad  $MS$  zwischen 0,1 und 0,8 liegt sowie das C2/C6-Verhältnis der Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2 und C6 der Anhydroglucosen zwischen 2 und 15 liegt.

7. Verfahren zur Herstellung von Imidazoliden gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die wasserfreien Aldonsäuren bzw. Aldonsäure-Laktone in wasserfreiem, aprotischem Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO), N-Methyl-pyrrolidon, Dimethylacetamid (DMF) oder Dimethylformamid (DMA) gelöst werden, gegebenenfalls unter Wärme, dem Ansatz N'-N-dicarbonylimidazol zugegeben wird im molaren Verhältnis 1:1 zur Aldonsäure und bei  $10 - 40^\circ\text{C}$  zwischen 30 Minuten und 24 Stunden umgesetzt wird.

8. Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an freien Amino-Funktionen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, dass Imidazole der am reduzierenden Kettenende selektiv zur Aldonsäure oxidierten Polysaccharide bzw. Polysaccharid-Derivate damit umgesetzt werden unter Ausbildung von stabilen Amidbindungen.

9. Verfahren nach Anspruch 8 dadurch gekennzeichnet, dass die Polysaccharide Abbaufractionen der Wachsmaisstärke sind und ihre Hydroxyethyl-derivate.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen